

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
15. Januar 2004 (15.01.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/005540 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **C12Q 1/68**,
G01N 33/574, C07K 16/18, A61P 35/00

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE2003/001986

(22) Internationales Anmeldedatum:
12. Juni 2003 (12.06.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
102 30 631.1 2. Juli 2002 (02.07.2002) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von I/S): **METAGEN PHARMACEUTICALS GMBH**
[DE/DE]; Oudenarder Strasse 16, 13347 Berlin (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **HERBERTH, Gunda**
[DE/DE]; Oudenarder Strasse 16, 13347 Berlin (DE).
DAHL, Edgar [DE/DE]; Oudenarder Strasse 16, 13347
Berlin (DE).

(74) Anwälte: **JUNGBLUT, Bernhard** usw.; Albrecht, Lücke
& Jungblut, Patentanwälte, Gelfertstrasse 56, 14195 Berlin
(DE).

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE,
SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,
DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL,
PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu ver-
öffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Ab-
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Co-
des and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der
PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: **USES OF NGAL-BINDING SUBSTANCES IN THE DIAGNOSIS AND TREATMENT OF CANCER DISEASES**

(54) Bezeichnung: **VERWENDUNGEN VON AN NGAL BINDENDEN SUBSTANZEN ZUR DIAGNOSE UND BEHAND-
LUNG VON KREBSERKRANKUNGEN**

(57) Abstract: The invention relates to the uses of Ngal in the diagnosis and treatment of cancer and in the screening of substances
for the purposes thereof.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft Verwendungen von Ngal zur Diagnose und Behandlung von Krebs sowie zum
Screenen nach Substanzen für solche Zwecke.



WO 2004/005540 A2

Verwendungen von an Ngal bindenden Substanzen zur Diagnose und Behandlung von Krebserkrankungen.

5 Gebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft neue Verwendungen von Ngal oder
daraus abgeleiteten Sequenzen zum Screenen nach daran bin-
denden Substanzen, sowie die Verwendung von an Ngal bin-
10 denden Substanzen zur Diagnose und/oder Behandlung von
Tumor-Erkrankungen.

Hintergrund der Erfindung und Stand der Technik

15

Ngal, auch Lipocalin-2 (LCN2) genannt, ist ein Protein,
welches in den Granulozyten mit der neutrophilen Ge-
latinase assoziiert ist (L. Kjeldsen et al., J Biol Chem,
268:10432-10432 (1993) und weist ein Molekulargewicht von
20 ca. 25 kD auf. Es wird vermutet, daß Ngal auf inflammato-
rische Reaktionen modulierend wirkt und an kleine lipo-
phile Moleküle und Formylpeptide (fmlp), welche von
Bakterien abgeleitet sind, bindet. Letzteres konnte al-
lerdings von einer anderen Gruppe experimentell nicht
25 bestätigt werden (D.H. Goetz et al., Biochemistry,
39:1935-1945 (2000)).

Ngal wurde durch Sreenen einer humanen Genombibliothek mit
Ngal cDNA als ein Gen mit 7 Exons identifiziert (J.B. Cow-
30 land et al., Genomics 45:17-23 (1997)). Das primäre Tran-
skript hat eine Länge von 3696 Nukleotiden und das
prozessierte Transkript ist 809 Nukleotide lang. In der
Literaturstelle L. Kjeldsen et al., (2000) ist Expression

von Ngal in verschiedensten humanen Normalgeweben beschrieben worden. Ngal liegt auf Chromosom 9q34 (P. Chan et al., Genomics 23:145-150 (1994)). Klonierung und Expression humaner Ngal cDNA, welche aus Knochenmark und 5 Ovar Zelllinien stammt, ist in der Literaturstelle S. Bartsch et al., FEBS Lett 9:255-259 (1995), beschrieben.

Hohe Ngal Pegel wurden in Adenocarcinomen der Lunge, des Dickdarms und des Pankreas gefunden. Dagegen sind Ngal 10 Pegel in Renalzellcarzinoma verschiedener Subtypen und Prostatatumoren niedrig. Lymphoma und Thymustumore waren in immunhistochemischen Versuchen Ngal-negativ (A. Friedl et al., The Histochemical Journal 31:433-441 (1999)). Gemäß der Literaturstellen US-5,627,034, US-5,773,290 und 15 US-5,846,739 und US-A-726725 ist die Proliferation von Brustkrebszellen mit Ngal Überexpression korreliert. Ein Zusammenhang mit Ovar tumor ist in der Literaturstelle WO-99/53040 offenbart.

20 Erkenntnisse aus gepaarten Tumor-/Normalgeweben sind für andere Krebsarten nicht bekannt.

Krebs, insbesondere Ovar-, Kolon-, Lungen- und Uteruskrebs ist eine mit zunehmendem Alter mit beachtlicher Incidenz 25 auftretende Erkrankung. Bislang wird diese Tumorerkrankung im wesentlichen pathologisch diagnostiziert und meist durch Entfernung behandelt. Die Entfernung von Organen hat verschiedene nachteilige Effekte auf einen Patienten. Eine verbesserte Diagnose und Behandlung dieser Krebsart, ins- 30 besondere ohne das Erfordernis einer Entfernung des Organes, ist daher in hohem Maße wünschenswert.

Technisches Problem der Erfindung

Der Erfindung liegt das technische Problem zugrunde, pharmazeutische Zusammensetzungen zur Diagnose und/oder zur Behandlung von Krebserkrankungen anzugeben sowie Mittel zu deren Identifizierung.

10 Grundzüge der Erfindung sowie bevorzugte Ausführungsbeispiele.

Die Erfindung lehrt die Verwendung einer für Ngal codierenden Nukleinsäure und/oder eines Ngal Peptids oder Proteins zur Detektion von Krebs, insbesondere von Ovar-, Kolon-, Lungen- und/oder Uteruskrebs, oder zur Detektion eines Risikos der Erkrankung an Krebs, insbesondere von Ovar-, Kolon-, Lungen- und/oder Uteruskrebs, wobei eine Gewebeprobe (des betreffenden Gewebes) auf Übertranskription von Ngal RNA oder auf Überexpression eines Ngal Proteins untersucht wird. Eine an für Ngal codierende Nukleinsäure oder eine an Ngal Protein oder Peptid bindende Detektorsubstanz, vorzugsweise enthaltend eine Reportergruppe, kann verwendet werden, wobei Bindung besagter Nukleinsäure und/oder besagten Proteins oder Peptids an die Detektorsubstanz halbquantitativ oder quantitativ detektiert wird.

Die Erfindung lehrt weiterhin die Verwendung einer Ngal RNA oder eines Ngal Proteins oder Peptids zum Screenen nach daran bindenden Substanzen, insbesondere prospektiven Wirkstoffen zur Inhibierung von besagter RNA oder besagtem Protein oder Peptid oder prospektiven Detektorsubstanzen,

wobei eine prospektive Substanz oder eine Mischung solcher prospektiver Substanzen mit besagter RNA oder besagtem Protein oder Peptid kontaktiert wird, wobei mit einem Bindungsassay Bindungsereignisse festgestellt werden, und
5 wobei eine bindende prospektive Substanz, ggf. nach Dekonvolutierung, als zur Detektion und/oder Behandlung von Krebs, insbesondere von Ovar-, Kolon-, Lungen- und/oder Uteruskrebs, geeignet selektiert wird.

- 10 Die Erfindung lehrt schließlich die Verwendung einer Ngal inhibierenden oder daran bindenden Substanz zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung von Krebs, insbesondere von Ovar-, Kolon-, Lungen- und/oder Uteruskrebs. Die Substanz kann ein Antikörper sein,
15 welcher beispielsweise durch Immunisierung eines nicht-menschlichen Säugetiers mit einem Ngal Peptid oder Protein, oder mit Ngal cDNA, oder mit mit cDNA von Ngal transient oder stabil transfizierten Zellen (z.B. Tumorzelllinien, NIH3T3, CHO, COS), oder mit endogen Ngal
20 exprimierenden Tumorzellen oder mit in Insektenzellen hergestelltem Ngal erhältlich ist, oder ein Phage-Display Antikörper ist.

Die Substanz kann aber auch eine Mimikriverbindung eines
25 Antikörpers gegen ein Ngal Peptid oder Protein sein. Die Substanz kann schließlich ein Aptamer, eine antisense RNA, eine inhibitorische RNAi, oder ein Ribozym sein. Die Substanz kann zusätzlich eine zytotoxische und/oder immunstimulierende Komponente tragen. Die pharmazeutische
30 Zusammensetzung kann zur systemischen oder lokalen Applikation in Tumorzellen enthaltendem Gewebe hergerichtet sein.

Die Erfindung läßt sich im Rahmen eines Verfahrens zur Diagnose einer Krebserkrankung, insbesondere von Ovar-, Kolon-, Lungen- und/oder Uteruskrebs, verwenden, wobei eine Detektorsubstanz in einer Ausführungsform mit einer Reportergruppe in zu untersuchendes Gewebe appliziert wird, wobei das zu untersuchende Gewebe dann einer Detektionsverfahrenstufe unterworfen wird, welche sensitiv für die Reportergruppe ist, und wobei im Fall der Detektion eines definierten Mindestwertes der Reportergruppe im Gewebe das Gewebe als Tumorzellen enthaltend qualifiziert wird, sowie eines Verfahrens zur Behandlung einer Krebserkrankung, insbesondere von Ovar-, Kolon-, Lungen- und/oder Uteruskrebs, wobei eine erfindungsgemäße pharmazeutische Zusammensetzung in einer physiologisch wirksamen Dosis einem Patienten dargereicht wird.

Die Erfindung beruht auf der Erkenntnis, daß Ngal, überexprimiert ist bzw. differenziell exprimiert wird in Tumoren, i.e. in besagten Tumorgeweben ist die Expression höher, verglichen mit (gepaarten) normalen Zellen gleichen Gewebes, und der daraus herleitbaren technische Lehre, daß Ngal als Zielmolekül bei der Diagnostik und Therapie dieser Erkrankung eingesetzt werden kann. Ngal kann also als Marker zur Identifizierung von Tumorzellen in den besagten Tumorgeweben dienen. Auf der anderen Seite bietet die Inhibierung von Ngal, insbesondere auch bei lokaler Applikation, die Möglichkeit, in die Tumor-spezifischen Ngal Assoziationen mit anderen Prozessen in den Tumorzellen einzugreifen und somit letztendlich den tumorzellenspezifisch veränderten Stoffwechsel zu stören und zu einem Absterben oder zumindest einer Wachstumshemmung der Tumorzellen beizutragen.

Im Rahmen der Erfindung kann es sich empfehlen, im Vorfeld einer Behandlung mit einer erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzung eine Probe aus einem Gewebe, welches als Tumorgewebe mit anderen Methoden identifiziert ist, zu entnehmen und die Gewebeprobe auf Expression bzw. Überexpression von Ngal zu untersuchen. Alternativ kann mit einer erfindungsgemäßen Detektorsubstanz zur Diagnose in vivo auf Ngal Abhängigkeit getestet werden. Wird eine Expression bzw. Überexpression von Ngal gegenüber Normalgewebe gleichen Typs festgestellt, so ist die Anwendung der erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzung indiziert.

Handelt es sich bei dem Tumor um einem Typus, bei welchem Tumorzellen Ngal exprimieren, Normalzellen gleichen Gewebetyps jedoch nicht, so ist es besonders bevorzugt, wenn die an Ngal bindende Substanz zusätzlich eine zytotoxische und/oder immunstimulierende Komponente trägt. Dies führt dann letztendlich dazu, dass praktisch ausschließlich Tumorzellen getötet werden, sei es durch die Zytotoxizität, sei es durch Angriff durch das stimulierte Immunsystem, während Normalzellen in dem Gewebe praktisch vollständig erhalten bleiben. In dieser Ausführungsform braucht die bindende Substanz selbst nicht inhibierend auf Ngal zu wirken, da die bindende Substanz dann lediglich als Marker funktionieren muß, welcher die Komponenten zu Ziel-Tumorzellen trägt. Im Falle des Einsatzes einer zytotoxischen und/oder immunstimulierenden Komponente wird es sich besonders empfehlen, wenn die pharmazeutische Zusammensetzung zur lokalen Applikation in Tumorzellen enthaltendem Gewebe hergerichtet ist, beispielsweise zur Injektion.

Von selbstständiger Bedeutung im Rahmen der Erfindung ist eine Verwendung eines Ngal Proteins in einem Screening Verfahren zur Findung von die Sekretion von Ngal modulierenden Substanzen. Dies kann beispielsweise dergestalt erfolgen, daß Ngal exprimierende Zellen, insbesondere Ngal exprimierende Tumorzellen der genannten Tumorarten, in einem Medium kultiviert werden, wobei vor oder während der Kultivierung mit einer prospektiven, die Sekretion inhibierende Substanz oder mit einer Mischung solcher Substanzen inkubiert wird, wobei das Medium nach einer definierten Kultivierungsdauer auf Ngal analysiert wird, optional nach Abtrennung des Mediums von den Zellen, und wobei die Substanz, ggf. nach Dekonvolution, selektiert wird, wenn die Menge detektierten Ngal im Medium einen definierten Grenzwert unterschreitet. Bei dieser Ausführungsform ist der tatsächliche Sekretionsweg irrelevant, da nur die Sekretion als solche das Selektionskriterium ist. Der definierte Grenzwert kann durch Kultivierung unter gleichen Bedingungen, jedoch ohne Inkubation mit einer prospektiven, die Sekretion inhibierenden Substanz, ermittelt werden. Als Selektionskriterium kann eine Sekretionsrate angesetzt werden, welche zumindest 10%, vorzugsweise zumindest 50%, höchstvorzugsweise zumindest 90%, unterhalb der Referenz-Sekretionsrate liegt.

Von weiterhin selbstständiger Bedeutung ist die alternative Verwendung eines Ngal Proteins in einem Screening Verfahren zur Findung einer Ngal inhibierenden aber nicht dessen Sekretion inhibierenden Substanz, wobei Ngal exprimierende Zellen in einem Medium kultiviert werden, wobei vor oder während der Kultivierung mit einer gemäß Anspruch 3 selektierten Substanz oder mit einer Mischung

solcher Substanzen inkubiert wird, wobei das Medium nach einer definierten Kultivierungsdauer auf Ngal analysiert wird, optional nach Abtrennung des Mediums von den Zellen, und wobei die Substanz, ggf. nach Dekonvolution, selektiert wird, wenn die Menge detektierten Ngal im Medium einen definierten Grenzwert überschreitet. Zu weiteren Ausbildungen gelten die vorstehenden Ausführungen analog.

Diese Ausführungsform der Erfindung beruht auf der Erkenntnis, daß sezerniertes Ngal in zumindest einigen Immunzellen, welche bei der Tumorabwehr eine Rolle spielen, Apoptose induziert. Insoweit hat Ngal parakrine Wirkung. Sezerniertes Ngal hat bezüglich der Proliferation von Tumorzellen jedoch auch autokrine Wirkung, i.e. Proliferation wird durch sekretiertes Ngal induziert. Die Sekretion von Ngal hat folglich einen unerwünschten synergistischen Effekt, nämlich einerseits Proliferationsförderung im Falle der Tumorzellen und andererseits Induktion der Apoptose in Immunzellen, die Tumorzellen angreifen. Hieraus folgen grundsätzlich zwei therapeutische Ansätze, nämlich:

- i) Inhibierung von Ngal in den Tumorzellen selbst, wodurch letztlich auch die Sekretion unterbleibt oder nur inaktives Ngal sekretiert wird, und/oder
- ii) Inhibierung von sekretiertem Ngal, i.e. außerhalb der Tumorzellen, wodurch einerseits eine Induktion der Proliferation der Tumorzellen unterbleibt und andererseits die die Tumorzellen angreifenden Immunzellen vor Ngal induzierter Apoptose geschützt werden. Es ergeben sich somit potentielle Wirkstoffe mit den folgenden Grundeigenschaften:

- i) Inhibierung von Ngal in der Tumorzelle; hierfür muß der Wirkstoff membrangängig sein, ii) Inhibierung der Sekretion von Ngal; ein solcher Wirkstoff greift nicht notwendigerweise (kann aber auch) in die intrazelluläre Ngal

Bildung ein, sondern inhibiert den Membrandurchtritt gebildeten Ngals, iii) Inhibierung von vorwiegend oder ausschließlich extrazellulären Ngal; ein solcher Wirkstoff ist nicht oder nur schlecht membrangängig (z.B. Antikörper). Letztendlich erfolgt somit neben der Inhibierung der pro-proliferativen Wirkung des Ngal auf Tumorzellen auch eine (Re-) Aktivierung der natürlichen Immunantwort auf den Tumor.

- 10 Im Rahmen der Erfindung ist auch gefunden worden, daß Tumorzellen (z.B. humane Ovar tumorproben) praktisch ausschließlich Ngal in monomerer Form sezernieren, während beispielsweise Granulozyten und transfizierte Insektenzellen sowohl das Monomer als auch ein Dimer sezernieren.
- 15 Dies kann einerseits diagnostisch genutzt werden zum Nachweis von Tumorzellen und zwar durch Nachweis der Sekretion überwiegend oder ausschließlich als Monomer. Des weiteren kann eine therapeutische Nutzung dadurch erfolgen, daß beispielsweise eine Dimerisierung, als Homo- oder
- 20 als Heterodimer, induziert wird, wobei das so induzierte Dimer biologisch inaktiv bzw. inaktiviert ist.

Definitionen.

25

- Im Rahmen dieser Beschreibung wird die Bezeichnung Ngal für alle humanen Isoformen, bekannt oder neu, auf Nukleinsäuren- oder Aminosäurenbasis, verwendet. Mit diesen Begriffen mit umfaßt sind auch die im Rahmen dieser
- 30 Beschreibung offenbarten kurzen Sequenzen, welche aus den Isoformen stammen, beispielsweise Immunisierungssequenzen. Weiterhin mit umfaßt sind auch Homologe, wobei die Homologie zumindest 80%, vorzugsweise mehr als 90%,

höchstvorzugsweise mehr als 95%, beträgt. Im Falle der Nukleinsäuresequenzen sind auch komplementäre oder allelische Varianten mit umfaßt. Weiterhin sind Sequenzen umfaßt, welche lediglich Teilsequenzen der explizit offen-

5 barten Sequenzen, beispielsweise ein Exon oder mehrere Exons, oder komplementärer Sequenzen hierzu darstellen, mit der Maßgabe, daß diese Teilsequenzen im Falle der Nukleinsäuren eine für eine Hybridisierung mit einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure hinreichende Länge, zumindest

10 50 Basen, aufweisen und im Falle der Proteine bzw. Peptide mit zumindest gleicher Affinität an ein protein- oder peptidspezifisches Zielmolekül binden. Weiterhin sind alle mit erfindungsgemäßen Nukleinsäuren hybridisierende Nukleinsäuren umfaßt, nämlich solche, die unter stringenten

15 Bedingungen (z.B. 5°C bis 25°C unterhalb der Aufschmelztemperatur; siehe ergänzend J.M. Sambrook et al., A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) und E.M. Southern, J Mol Biol, 98:503ff (1975)) hybridisieren. Es versteht sich, daß die Erfindung auch Expres-

20 sionskassetten umfaßt, i.e. eine oder mehrere der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen mit mindestens einer Kontroll- oder regulatorischen Sequenz. Eine solche Expressionskassette kann auch eine Sequenz für ein bekanntes Protein umfassen, wobei im Zuge der Translation

25 ein Fusionsprotein aus einem bekannten Protein und einem erfindungsgemäßen Protein oder Peptid entsteht. Ebenso sind auch antisense Sequenzen zu den vorstehenden Nukleinsäuresequenzen umfaßt. Schließlich sind RNA sowie damit korrelierende DNA und umgekehrt umfaßt, ebenso wie geno-

30 mische DNA als auch korrelierte cDNA und umgekehrt.

Im Zusammenhang mit erfindungsgemäßen Verwendungen umfassen die Begriffe der Ngal Nukleinsäuren oder Proteine bzw.

Peptide neben den Volllängen der offenbarten Sequenzen (siehe auch vorstehender Absatz) auch Teilsequenzen heraus, und zwar mit einer Mindestlänge von 12 Nukleotiden, vorzugsweise 30 bis 90 Nukleotiden, im Falle der Nukleinsäuren und einer Mindestlänge von 4 Aminosäuren, vorzugsweise 10 bis 30 Aminosäuren, im Falle der Peptide oder Proteine.

Die Begriffe der Detektion und/oder der Behandlung von Tumorerkrankungen, insbesondere der angegebenen Tumorerkrankungen, umfassen auch die Detektion und/oder Behandlung von Metastasen aus Primärtumoren in sonstigen Geweben. Der Begriff der Behandlung umfaßt auch die Prophylaxe.

Als Inhibitor ist eine Verbindung oder Substanz bezeichnet, welche entweder die Bildung von Ngal inhibiert oder gebildetes Ngal in der Aktivität reduziert, bezogen auf die Ngal Aktivität in Abwesenheit des Inhibitors. Insofern kann ein Inhibitor einerseits eine Substanz sein, welche in der Entstehungskaskade von Ngal inhibierend eingreift. Auf der anderen Seite kann ein Inhibitor eine Substanz sein, welche mit gebildetem Ngal eine Bindung eingeht, und zwar dergestalt, dass weitere physiologische Wechselwirkungen mit endogenen Substanzen zumindest reduziert sind.

Mimikry-Moleküle sind Verbindungen, die den variablen Bereich, insbesondere den Bindungsbereich eines Antikörpers, nachbilden und an gleicher Stelle eines Zielmoleküls binden, wie der zu Grunde liegende Antikörper.

Der Begriff der Antikörper umfaßt polyklonale Antikörper, monoklonale Antikörper, nicht-humane, humane und

humanisierte Antikörper, sowie Phage-Display-Antikörper, aber auch chimäre Antikörper und antiidiotypische Antikörper sowie spezifische Fragmente der leichten und/oder der schweren Kette des variablen Bereiches zu Grunde liegender Antikörper vorstehender Art. Die Herstellung bzw. Gewinnung solcher Antikörper mit vorgegebenen Immunogenen ist dem Durchschnittsfachmann wohl vertraut und braucht nicht näher erläutert zu werden. Weiterhin umfaßt der Begriff der Antikörper bispezifische Antikörper. Bispezifische Antikörper kombinieren eine definierte Immunzellaktivität mit einer spezifischen Tumorzellerkennung, wodurch Tumorzellen getötet werden. Ein bispezifischer Antikörper bindet einerseits an ein Auslösemolekül der Immun-Effektorzelle (z.B. CD3, CD16, CD64) und andererseits an Antigene der Tumorzielzelle.

Die galenische Herrichtung einer erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzung kann in fachüblicher Weise erfolgen. Als Gegenionen für ionische Verbindungen kommen beispielsweise Na^+ , K^+ , Li^+ oder Cyclohexylammonium infrage. Geeigente feste oder flüssige galenische Zubereitungsformen sind beispielsweise Granulate, Pulver, Dragees, Tabletten, (Mikro-) Kapseln, Suppositorien, Sirupe, Säfte, Suspensionen, Emulsionen, Tropfen oder injizierbare Lösungen (i.v., i.p., i.m.) sowie Präparate mit protrahierter Wirkstoff-Freigabe, bei deren Herstellung übliche Hilfsmittel wie Trägerstoffe, Spreng-, Binde-, Überzugs-, Quellungs-, Gleit- oder Schmiermittel, Geschmacksstoffe, Süßungsmittel und Lösungsvermittler, Verwendung finden. Als Hilfsstoffe sei Magnesiumcarbonat, Titandioxyd, Lactose, Mannit und andere Zucker, Talcum, Milcheiweiß, Gelatine, Stärke, Zellulose und ihre Derivate, tierische und pflanzliche Öle wie Lebertran, Sonnenblumen-, Erdnuss-

oder Sesamöl, Polyethylenglycole und Lösungsmittel, wie etwa steriles Wasser und ein- oder mehrwertige Alkohole, beispielsweise Glycerin, genannt. Eine erfindungsgemäße pharmazeutische Zusammensetzung ist dadurch herstellbar, 5 dass mindestens ein erfindungsgemäß verwendeter Ngal Inhibitor in definierter Dosis mit einem pharmazeutisch geeigneten und physiologisch verträglichen Träger und ggf. weiteren geeigneten Wirk-, Zusatz- oder Hilfsstoffen mit definierter Inhibitor-dosis gemischt und zu der gewünschten 10 Darreichungsform hergerichtet ist.

Tumorzellen exprimieren Ngal differenziell, wenn Normalzellen des gleichen Gewebetyps dieses nicht exprimieren. Tumorzellen überexprimieren Ngal spezifisch bzw. differen- 15 ziell, wenn Ngal im Vergleich zu Normalzellen des gleichen Gewebes zumindest in doppelter Menge exprimiert wird.

Zytotoxische Komponenten bzw. Gruppen sind Verbindungen, welche direkt oder indirekt Apoptose einleiten bzw. zu 20 Nekrose führen oder zumindest wachstumshemmend wirken. Solche Gruppen bzw. Verbindungen können neben Radioisotopen (z.B. ^{188}Re , ^{213}Bi , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{90}Y , ^{131}I , ^{177}Lu) insbesondere Zytostatika sein, welche in der Tumorthherapie eingesetzt werden. Beispiele hierfür sind: Alkylantien 25 (z.B. Mechlorethamin, Ifosfamid, Chlorambucil, Cyclophosphamid, Melphalan, Alkylsulfonate, Busulphan, Nitrosoharnstoffe, Carmustin, Lomustin, Semustin, Triazene, Dacarbazin), Antimetaboliten (z.B. Folsäure-Antagonisten, Methotrexat, Pyrimidin-Analoga, Fluoruracil, Fluord- 30 esoxyuridin, Cytarabin, Gemcitabin, Purin-Analoga, Mercaptopurin), Mitosehemmer (z.B. Vincaalkaloide, Vincristin, Vinblastin, Paclitaxal, Docetaxel, Protaxel), Epipodophylotoxine (z.B. Etoposid, Teniposid), Antibiotika (z.B.

- Dactinomycin, Daunorubicin, Idarubicin, Anthracycline, Bleomycin, L-Asparaginase), Platinkomplexverbindungen (z.B. Cisplatin), Hormone und verwandte Verbindungen (z.B. Nebennierenrindensteroid, Aminogluthetimid, Gestagene, 5 Östrogene, Androgene, Antiöstrogene, Tamoxifen, Steroidanaloga, Flutamid). Bei Bindung einer solchen Verbindung mit einer an ngal bindenden Substanz erfolgt die Kopplung dergestalt, daß die Affinität zu ngal um nicht mehr als 90%, vorzugsweise 50%, bezogen auf die Substanz ohne zyto-
- 10 statische Gruppe, reduziert ist und die zytostatische Wirkung der Gruppe um nicht mehr als 90%, vorzugsweise 50%, bezogen auf die Verbindung ohne Substanz, reduziert ist.
- 15 Eine immunstimulierende Komponente ist meist ein Protein oder ein wirksamer Bestandteil hiervon, welches Zellen des Immunsystems stimuliert. Beispiele hierfür sind: Zytokine, wie M-CSF, GM-CSF, G-CSF, Interferone, wie IFN-alpha, -beta, -gamma, Interleukine wie IL-1 bis -16 (außer -8),
- 20 human LIF, Chemokine wie Rantes, MCAF, MIP-1-alpha, -beta, NAP-1 und IL-8.

Eine Reportergruppe ist ein Atom, Molekül oder eine Verbindung, welche in Verbindung mit einem hierauf abgestellten

25 ten Assay den Nachweis der Reportergruppe und der somit mit der Reportergruppe verbundenen Verbindung oder Substanz ermöglicht. Beispiele für Reportergruppen und hiermit assoziierte Detektionsmethoden sind: ³²P-Labeling und Intensitätsmessung mittels Phosphorimager. Viele weitere

30 Beispiele sind dem Durchschnittsfachmann bekannt und bedürfen nicht der detaillierten Aufzählung.

Eine an Ngal bindende Substanz kann eine Substanz sein, welche ein Ngal Protein oder eine Ngal RNA bindet.

Im Rahmen der vorstehenden Definition gegenüber dem engen
5 Wortsinn erweiterte Begriffsbestimmungen umfassen auch die bestimmten Begriffe im engen Wortsinn.

Optional können die Indikationen Brustkrebs oder Ovarkrebs in bestimmten Zusammenhängen, insbesondere im Falle von
10 Sequenzidentität von Teilsequenzen, insoweit ausgeschlossen sein.

Beispiele.

15

Im Folgenden wird die Erfindung anhand von lediglich bevorzugte Ausführungsformen darstellenden Beispielen und Figuren näher erläutert. Es zeigen:

20 Figur 1: Cancer profiling array zur Überexpression in Uterustumorgewebe,

Figur 2: Quantitative Auswertung zum Gegenstand der Figur 1,

25

Figur 3: verschiedene Hammerhead Ribozyme gegen Ngal,

Figur 4: verschiedene antisense RNA gegen Ngal,

30 Figur 5: inhibitorische RNA (RNAi) gegen Ngal,

Figur 6: Ngal-Sequenzen, Aminosäuresequenz (Seq.-ID 1, 6a) mit Markierung geeigneter

Immunisierungssequenzen (Seq.-ID 3 und 4) und
Nukleinsäuresequenz (Seq.-ID 2),

Figur 7: Western Blot von Lysaten und Zellkulturüber-
5 ständen verschiedener Ngal exprimierender
Zelllinien,

Figur 8: immunhistochemischer Nachweis von 2 Uteruskarzi-
10 nomen, und

Figur 9: Proliferationsassay in einer Kolontumorzelllinie.

15 Beispiel 1: Ngal Überexpression in Uterustumorgewebe.

Die Ngal Codierungssequenz wurde mit ^{32}P durch random hex-
amer priming gelabelt und auf ein cancer profiling
array von Clontech, welches 240 cDNA Bibliothekspaare en-
20 thält, wobei jedes Paar für jeweils ein Tumor- und ein
Normalgewebe eines Patienten steht. Die Ergebnisse sind in
der Figur 1 gezeigt. Man erkennt, daß eine Überexpression
in Uterustumorgewebe, verglichen mit Normalgewebe,
stattfindet. Dieser Befund ist quantifiziert in der Figur
25 2. Demnach zeigen 56% (25 aus 44) der untersuchten Uterus-
gewebepaare eine zumindest 2-fache Überexpression von
Ngal.

30 Beispiel 2: Nachweis von Ngal mittels Antikörpern

In diesem Beispiel wird die Markierung eines Tumors bzw.
seiner Metastasen durch einen anti-Ngal-Antikörper in vivo

(Mausmodell) beschrieben. Ein anti-Ngal-Antikörper wird mit einem Markermolekül (z. B. Radioisotop) markiert. In NMRI-Nacktmäuse werden $1-2 \cdot 10^6$ Ngal-transfizierte humane Zellen transplantiert. 30 Tage nach der Transplantation wird den Mäusen markierter Antikörper injiziert. Die Kontrolltiere werden mit einem nicht relevanten Antikörper behandelt. Wenige Stunden nach der Antikörperapplikation werden die Tiere getötet und aus allen Organen Gewebeschnitte angefertigt. Diese Schnitte werden auf die Gegenwart von markiertem anti-Ngal Antikörper untersucht.

Bei den anti-Ngal Antikörpern handelt es sich um polyklonale oder monoklonale Antikörper gegen humanes Ngal Protein, durch cDNA-Immunisierung oder konjugiert mit einem Trägerprotein, in Ratte oder Kaninchen gezogen und affinitätsgereinigt.

Geeignete Immunisierungssequenzen sind in der Figur 6a sowie den Sequenzen Seq.-ID 3 und 4 angegeben. Auch kann mit der Vollängen cDNA (Fig. 6b) gearbeitet werden.

Beispiel 3: Immunhistochemischer Nachweis von Tumorzellen.

Primäre Tumoren werden aus den Patienten mit Uterus- und/oder Ovarialtumoren isoliert und als Paraffin bzw. Gefrierschnitte präpariert. Diese Schnitte werden mit einem anti-Ngal-Antikörper auf die Überexpression von Ngal in Tumorzellen untersucht. Die immunhistologische Untersuchung mit dem Ngal-Antikörper zeigt höhere Expression von Ngal in den Tumorzellen im Vergleich zu umliegendem Normalgewebe. Die Untersuchung erfolgt im Einzelnen durch Inkubation mit dem anti-Ngal Antikörper als primärem

Antikörper aus Kaninchen oder Ratte, einem biotinyliertem sekundären anti-Kaninchen oder anti-Ratten Antikörper und einer Streptavidin-gekoppelten Meerrettichperoxidase. Die Färbung erfolgt mit mit AEC als chromogenen Substrat (rote Färbung). Die Gegenfärbung erfolgt mit Hemalaun-Lösung (blaue Färbung). Es sind maligne und nichtmaligne Zellen unterscheidbar, wobei die malignen Zellen eine starke Färbung, i.e. hohen Ngal Gehalt, aufweisen, während die nichtmalignen Zellen nur moderat gefärbt sind.

10

In den Figuren 8a,b sind Ergebnisse mit anti-Ngal Antikörpern aus der Ratte in zwei Uteruskarzinomen (Paraffinschnitte) dargestellt. Jeweils unten sind Schnitte mit anti-Ngal Antikörpern zu sehen, während jeweils oben zugeordnete Negativkontrollen mit einer Färbung mit Prä-Immunserum aus der Ratte dargestellt sind.

Beispiel 4: RNA-Inhibitoren

20

In der Figur 3 sind verschiedene Hammerhead Ribozyme dargestellt, die Ngal an den dargestellten Stellen schneiden und so die Aktivität eventueller Translationsprodukte inhibieren oder zumindest reduzieren (Seq.-ID 5 und 6; Hammerhead).

Die Figur 4 zeigt verschiedene antisense Sequenzen für Ngal RNA (Seq.-ID 7 und 8).

30 Figur 5 zeigt ein PCR-Produkt für die Generierung von Ngal-Spezifischen, doppelsträngigen RNAi. In Fettdruck sind PCR-Primer für die Generierung von RNAi Proben dargestellt. In Großbuchstaben ist ein T7 RNA-Polymerase

Promotor und Kleinbuchstaben eine Ngal-spezifische Nukleotidsequenz dargestellt.

5 Beispiel 5: Sekretion von Ngal

Es wurden Kolontumorzelllinien (HT29) und Ovarumorzelllinien (SKOV3 und OV90) in 0,5% FCS-haltigem Zellkulturmedium kultiviert. Nach einer Kultivierungsdauer von 1
10 Stunde sowie 12 Stunden wurden Kulturüberstände entnommen und mit einem Filter aufkonzentriert. Nach einer Proteinbestimmung wurden 16µg/µl Protein / Laufbahn auf ein 12%iges BisTris-Gel aufgetragen. Mit Ngal-spezifischen Antikörpern aus Ratte oder Kaninchen wurde auf dem Blot
15 die 25 kD Bande für Ngal identifiziert. Die Ergebnisse (anti-Ngal Antikörper aus Ratte) sind in der Figur 7 dargestellt (SN = Überstand, lys = Lysat). Man erkennt, daß in den Überständen der Zelllinien HT29 und SKOV3 eine Anreicherung von Ngal stattgefunden hat. Folglich wird
20 Ngal konstitutiv sezerniert.

Beispiel 6: Proliferationsassay an Kolontumorzelllinie.

25 Zellen der Kolontumorzelllinie HT29 wurden ohne besondere Zugabe, mit EGF (10 ng/ml), mit HGF (20 ng/ml) und mit Ngal (= ot115) in Konzentrationen von 1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml, oder 200 ng/ml für 72 h inkubiert. Die Proliferation wurde mittels des MTT Assays bestimmt. Dieser As-
30 say beruht auf der Reduktion von Tetrazoliumsalz zu Formazan in metabolisch aktiven Zellen. Die Auswertung erfolgte photometrisch. Man erkennt, daß Ngal eine mit EGF oder HGF vergleichbare Wirkung zeigt, i.e. daß

extrazellulär vorliegendes Ngal die Proliferation der Tumorzellen fördert.

5

10

15

20

25

30

Patentansprüche:

1. Verwendung einer für Ngal codierenden Nukleinsäure
5 und/oder eines Ngal Peptids oder Proteins zur Detektion von Krebs, insbesondere vom Ovar-, Kolon-, Lungen- und/oder Uteruskrebs, oder zur Detektion eines Risikos der Erkrankung an Krebs, insbesondere vom Ovar-, Kolon-, Lungen- und/oder Uteruskrebs, wobei eine Gewebeprobe auf
10 Übertranskription von Ngal RNA oder auf Überexpression eines Ngal Proteins untersucht wird.
2. Verwendung nach Anspruch 1, wobei eine an für Ngal cod-
15 ierende Nukleinsäure oder eine an Ngal Protein oder Peptid bindende Detektorsubstanz, vorzugsweise enthaltend eine Reportergruppe, verwendet wird, wobei Bindung besagter Nukleinsäure und/oder besagten Proteins oder Peptids an die Detektorsubstanz halbquantitativ oder
20 quantitativ detektiert wird.
3. Verwendung einer Ngal RNA oder eines Ngal Proteins oder
25 Peptids zum Screenen nach daran bindenden Substanzen, insbesondere prospektiven Wirkstoffen zur Inhibierung von besagter RNA oder besagtem Protein oder Peptid oder prospektiven Detektorsubstanzen, wobei eine prospektive Substanz oder eine Mischung solcher prospektiver Sub-
stanzen mit besagter RNA oder besagtem Protein oder Pep-
30 tid kontaktiert wird, wobei mit einem Bindungsassay Bindungsereignisse festgestellt werden, und wobei eine bindende prospektive Substanz, ggf. nach Dekonvolu-
tierung, selektiert wird.

4. Verwendung einer Ngal inhibierenden oder daran bin-
denden Substanz, vorzugsweise einer gleichzeitig die
5 Sekretion von Ngal nicht inhibierenden Substanz, zur
Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur
Behandlung von Krebs, insbesondere vom Ovar-, Kolon-,
Lungen- und/oder Uteruskrebs.
- 10
5. Verwendung nach Anspruch 4, wobei die Substanz ein An-
tikörper ist, welcher durch Immunisierung eines nicht-
menschlichen Säugetiers mit einem Ngal Peptid oder Pro-
tein, oder mit Ngal cDNA, oder mit mit cDNA von Ngal
15 transient oder stabil transfizierten Zellen, insbeson-
dere Tumorzelllinien, NIH3T3, CHO, COS, oder mit endogen
Ngal exprimierenden Tumorzellen oder mit in Insektenzel-
len hergestelltem Ngal erhältlich ist, oder ein Phage-
Display Antikörper ist.
- 20
6. Verwendung nach Anspruch 4, wobei die Substanz eine
Mimikriverbindung eines Antikörpers gegen ein Ngal Pep-
tid oder Protein ist.
- 25
7. Verwendung nach Anspruch 4, wobei die Substanz, ein
Aptamer, eine antisense RNA, oder ein Ribozym ist.
- 30
8. Verwendung nach einem der Ansprüche 4 bis 7, wobei die
Substanz zusätzlich eine zytotoxische und/oder immu-
stimulierende Komponente trägt.

9. Verwendung nach einem der Ansprüche 4 bis 8, wobei die pharmazeutische Zusammensetzung zur systemischen oder
5 lokalen Applikation in Tumorzellen enthaltendem Gewebe hergerichtet ist.
10. Verfahren zur Diagnose einer Krebserkrankung, insbesondere vom Ovar-, Kolon-, Lungen- und/oder Uteruskrebs, wobei eine Detektorsubstanz in einer Ausführungsform mit einer Reportergruppe in zu untersuchendes Gewebe appliziert wird, wobei das zu untersuchende Gewebe dann einer Detektionsverfahrenstufe
15 unterworfen wird, welche sensitiv für die Reportergruppe ist, und wobei im Fall der Detektion eines definierten Mindestwertes der Reportergruppe im Gewebe das Gewebe als Tumorzellen enthaltend qualifiziert wird.
- 20
11. Verfahren zur Behandlung einer Krebserkrankung, insbesondere vom Ovar-, Kolon-, Lungen- und/oder Uteruskrebs, wobei eine pharmazeutische Zusammensetzung nach
25 einem der Ansprüche 4 bis 9 in einer physiologisch wirksamen Dosis einem Patienten dargereicht wird.
12. Verwendung eines Ngal Proteins in einem Screening Verfahren zur Findung von die Sekretion von Ngal
30 modulierenden Substanzen.

13. Verwendung nach Anspruch 12, wobei Ngal exprimierende Zellen in einem Medium kultiviert werden, wobei vor oder während der Kultivierung mit einer prospektiven, die Sekretion inhibierende Substanz oder mit einer
- 5 Mischung solcher Substanzen inkubiert wird, wobei das Medium nach einer definierten Kultivierungsdauer auf Ngal analysiert wird, optional nach Abtrennung des Mediums von den Zellen, und wobei die Substanz, ggf. nach Dekonvolution, selektiert wird, wenn die Menge
- 10 detektierten Ngal im Medium einen definierten Grenzwert unterschreitet.
14. Verwendung nach Anspruch 13, wobei der definierte
- 15 Grenzwert durch Kultivierung unter gleichen Bedingungen, jedoch ohne Inkubation mit einer prospektiven, die Sekretion inhibierenden Substanz bestimmt wird.
- 20 15. Verwendung einer mit einem Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 14 selektierten Substanz zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung von Krebs, insbesondere von Ovar-, Kolon-, Lungen- und/oder Uteruskrebs.
- 25
16. Verwendung eines Ngal Proteins in einem Screening Verfahren zur Findung einer Ngal inhibierenden aber nicht dessen Sekretion inhibierenden Substanz, wobei Ngal
- 30 exprimierende Zellen in einem Medium kultiviert werden, wobei vor oder während der Kultivierung mit einer gemäß Anspruch 3 selektierten Substanz oder mit einer Mischung solcher Substanzen inkubiert wird, wobei das

Medium nach einer definierten Kultivierungsdauer auf Ngal analysiert wird, optional nach Abtrennung des Mediums von den Zellen, und wobei die Substanz, ggf. nach Dekonvolution, selektiert wird, wenn die Menge detektierten Ngal im Medium einen definierten Grenzwert überschreitet.

17. Verwendung nach Anspruch 16, wobei der definierte Grenzwert durch Kultivierung unter gleichen Bedingungen, jedoch ohne Inkubation mit einer prospektiven, die Sekretion inhibierenden Substanz bestimmt wird.
18. Verwendung einer mit einem Verfahren nach einem der Ansprüche 12, 13 oder 14 selektierten Substanz zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung von Krebs, insbesondere von Ovar-, Kolon-, Lungen- und/oder Uteruskrebs.

20

25

30

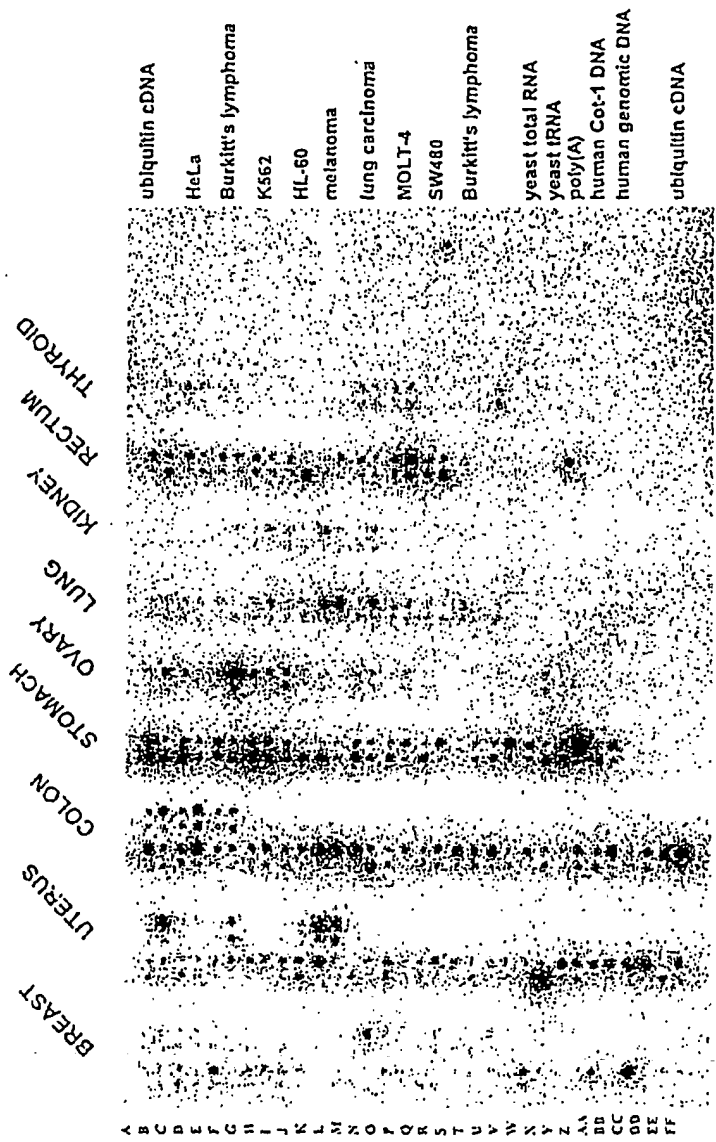


Fig. 1

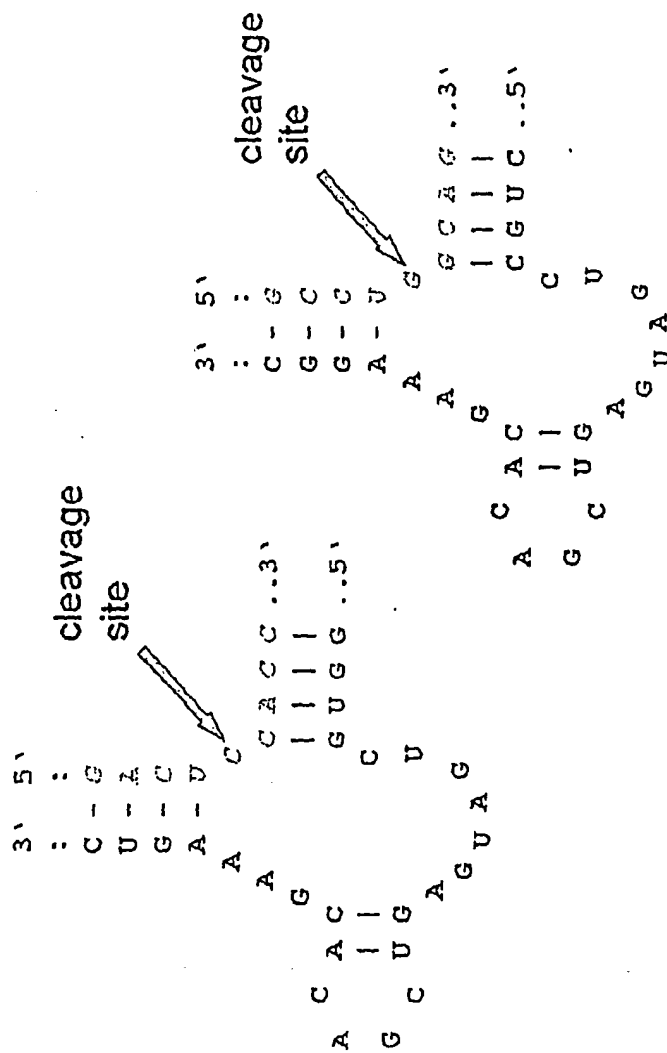


Fig. 3

NGAL-AS-1
CUAGGCCAGCCACAGGAGACCUAG

NGAL-AS-2
CCUGGGCAUGCAGAGCCCCCAACAG

Fig. 4

1 GAATTAATACGACTCACTATATAGGAGACTccacctcagacctgatcccg 50
51 cccacacctctgagcaagggtccctctgcagcagaacttccaggacaaccaa 100
101 tccagggggaagtggatgtggtaggcctggcaggggaatgcaattctcag 150
151 agaagacaaagaccccgcaaaaagatgtatgccaccatctatgagctgaaag 200
201 aagacaagagctacaatgtcacctccgtccctgtttaggaaaaaagaagtgt 250
251 gactactggatcaggacttttgttccaggttgccagcccgcgagttcac 300
301 gctgggcaacattaaagagtaccctggattaacgagttacctcggtccgag 350
351 tggtagcaccaactacaaccagcatgctatggtgttcttcaagaaaagtt 400
401 tctcaaaaacaggaggagtacttcaagatcacccctctacgggagaaaccaagga 450
451 gctgacttcggaaactaaaggagaaacttcacccgcttctccaaatctctgg 500
501 gcctccctgaaaaaccacatcggtcttccctgtctTCTCCCTATAGTGAGTCG 550
551 TATTAATTCT 559

Fig. 5

Peptidsequenzen für die Kaninchenimmunisierung:

10	20	30	40	50	60	70
MPLGLLWLP	PSLLGALHAQAQ	SDSTSDLI	PAPPLSKVPL	QQNFQDNQ	EQGKWYV	VVGLAGNAI
REDKDPQKM	YATIIYELKEDK	SYNVTSVLER	KKKCDYWIR	TEVPGCQ	PGGEFTL	GNIKSY
PPGLVQNHAMV	FFKKVSONREY	FKITLYGRT	KELTSELKEN	FIRFSKSL	GLPENHIV	FPVPIDQ
						CIDG

Fig. 6a

Cacgagtcacccccctgccaggcccagcagccaccacacagcgctgcttcctcgccctgaa
atcatgcccctaggtctcctgtggctggcctagccctgttggggctctgcatgcccag
gcccaggactccacctcagacctgatcccagccccacctctgagcaaggtccctctgcag
cagaacttccaggacaaccaattccagggggaagtggatgtggtaggcctggcagggaat
gcaattctcagagaagacaaagacccgcgcaaaagatgtatgccaccatctatgagctgaaa
gaagacaagagctacaatgtcacctccgtcctgtttaggaaaaaagaagtgtgactactgg
atcaggacttttgttccagggtgccagcccgcgaggtcacgctgggcaacattaaagagt
taccctggattaacgagttacctcgtccgagtggtgagcaccaactacaaccagcatgct
atggtgttctttaagaaagtttctcaaaacagggagtagtcaagatcacccctctacggg
agaaccaaggagctgacttcggaactaaaggagaacttcatccgcttctccaaatctctg
ggcctccctgaaaaccacacatcgtcttccctgtcccaatcgaccagtgatcgacggctga
gtg (Acc.No.: NM_005564)

Fig. 6b

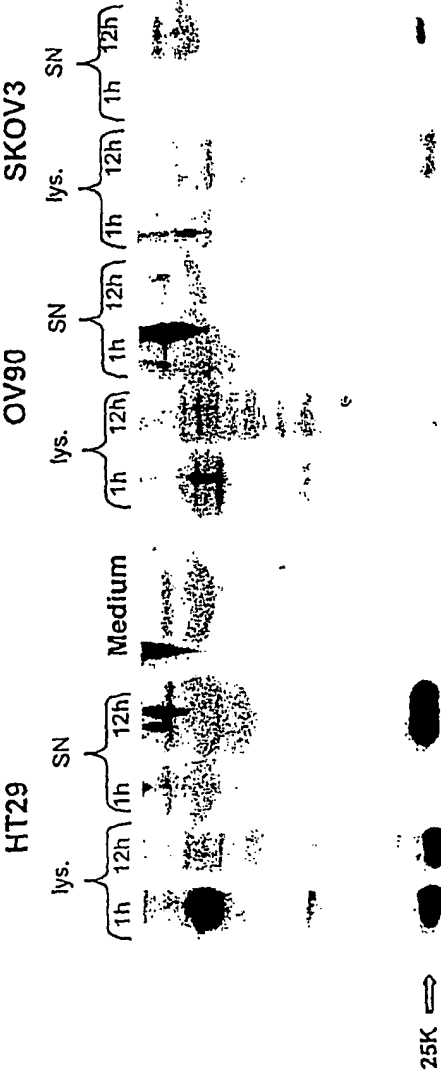
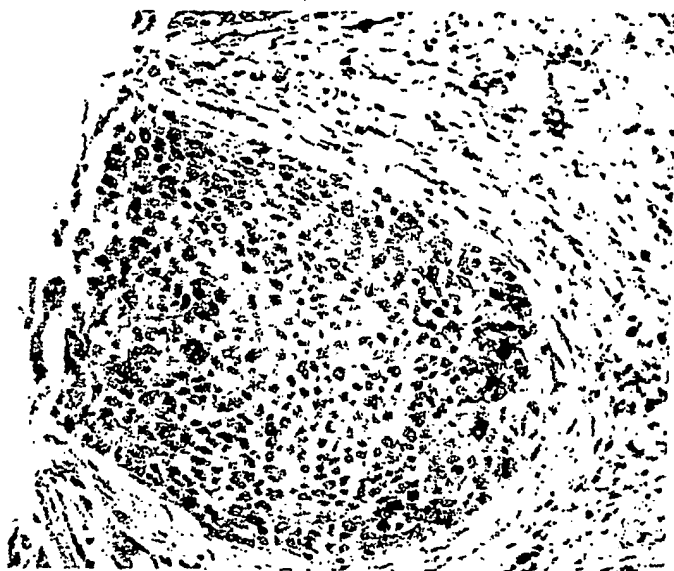
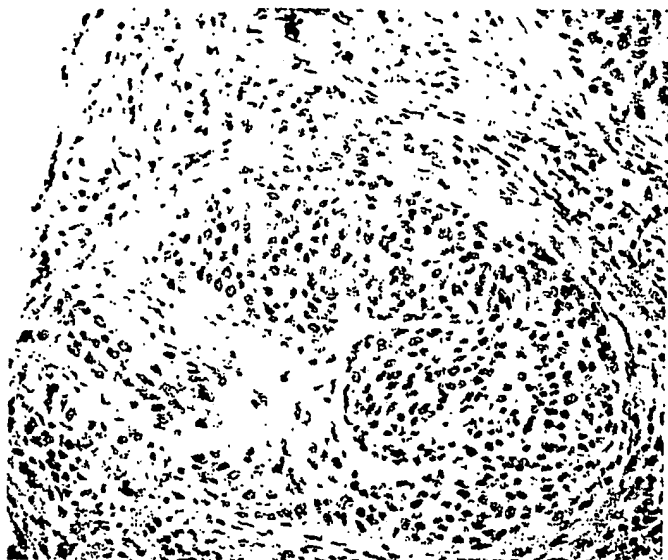
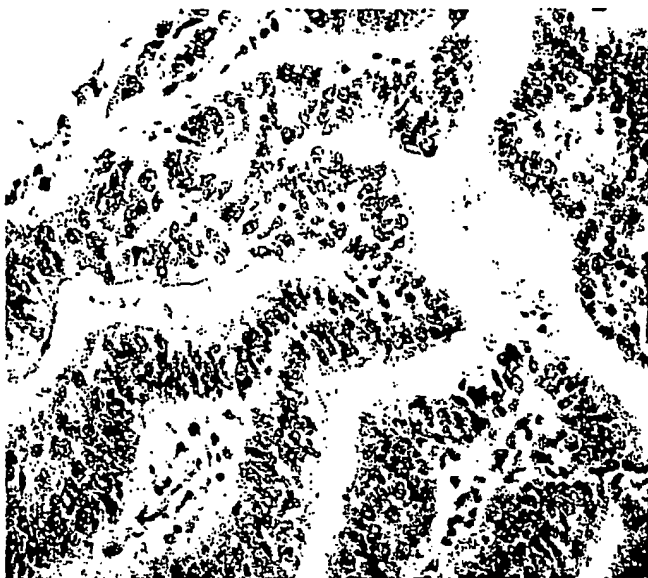


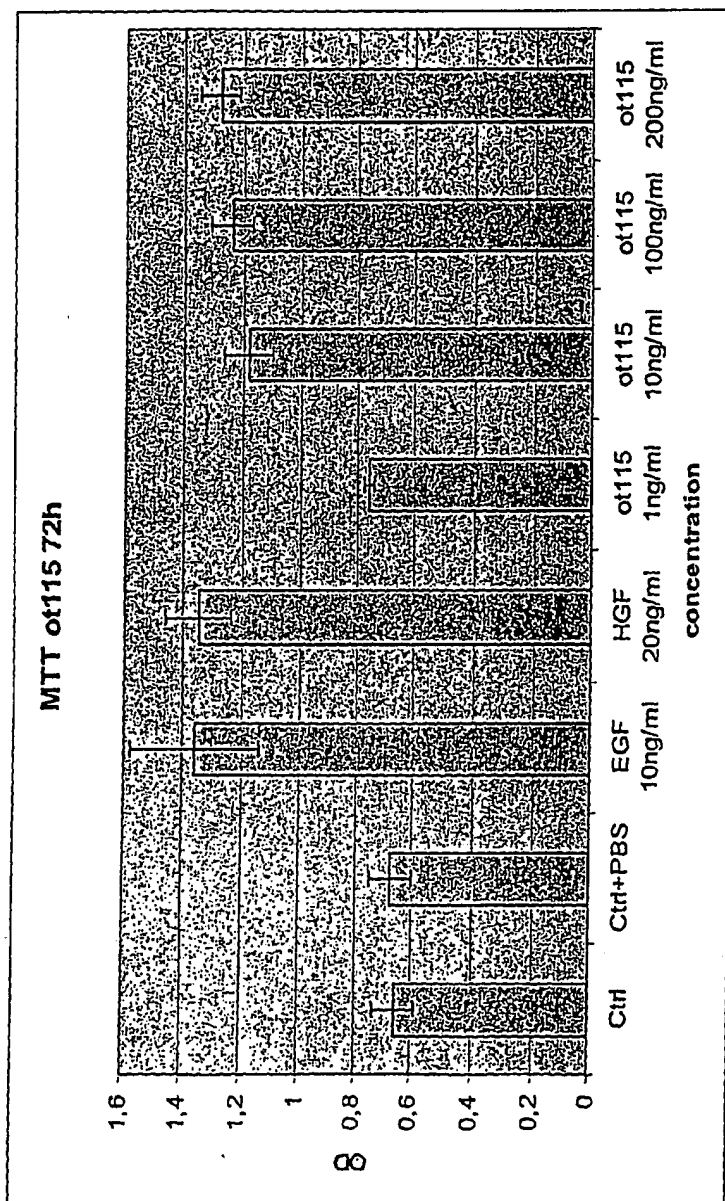
Fig. 7



Figur 8a



Figur 8b



Figur 9

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ BLACK BORDERS

☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☒ FADED TEXT OR DRAWING

☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.